

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-046217

(43)Date of publication of application : 15.03.1984

(51)Int.Cl.

A61K 31/35  
// C07D311/30  
C07D311/32  
C07D311/36

(21)Application number : 57-157103

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 09.09.1982

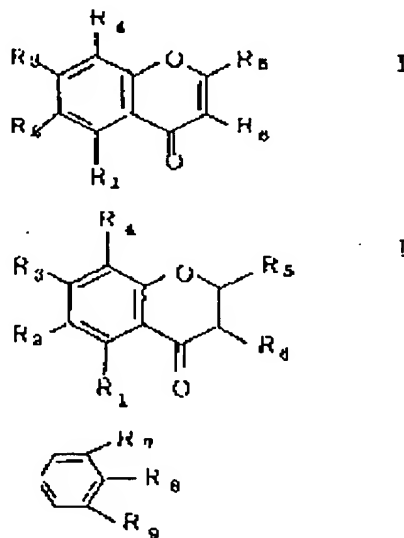
(72)Inventor : ISONO KIYOSHI  
ASAHI KENICHI

## (54) CARCINOSTATIC AGENT

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a low-toxic carcinostatic agent having differentiation inducing activity to the tumor cell of animal, and exhibiting excellent carcinostatic activity, by using a flavonoid or an isoflavonoid as an active component.

**CONSTITUTION:** The objective agent contains the compound of formula I or formula II [R<sup>1</sup>WR<sup>4</sup> are OH or OCH<sub>3</sub>; R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> are group of formula III (R<sup>7</sup>WR<sup>9</sup> are H, OH or OCH<sub>3</sub>), H, OH or OCH<sub>3</sub>], e.g. genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) as an active component. The agent can be administered orally or parenterally. Dose: 0.01W100mg/kg, preferably ≤ 10mg/kg daily for adult for oral administration, and preferably ≤ 2mg/kg for parenteral administration.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—46217

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 31/35

// C 07 D 311/30

311/32

311/36

識別記号

ADU

庁内整理番号

7330—4C

7169—4C

7169—4C

7169—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)3月15日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ 制癌剤

⑯ 特 願 昭57—157103

⑰ 出 願 昭57(1982)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和57年3月10日

発行社団法人日本農芸化学会の講演要旨集

(日本農芸化学会昭和57年大会)で発表

⑱ 発 明 者 磯野清

新座市野火止5—14—13

⑲ 発 明 者 旭健一

和光市諏訪原団地1—4—108

⑳ 出 願 人 理化学研究所

和光市広沢2番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 中村稔

外 4 名

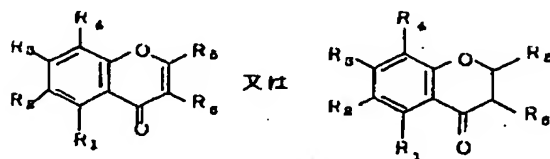
明細書の浄書(内容に変更なし)

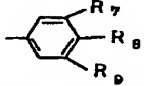
明 細 書

1. 発明の名称 制癌剤

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式



[ただし、式中  $R_1, R_2, R_3, R_4$  は  $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$ 、 $R_5, R_6$  は、 ( $R_7, R_8, R_9$  は  $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$  を示す。)、 $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$  を示す。]

で表わされるフラボノイド又はイソフラボノイド化合物を有効成分として含有することを特徴とする制癌剤。

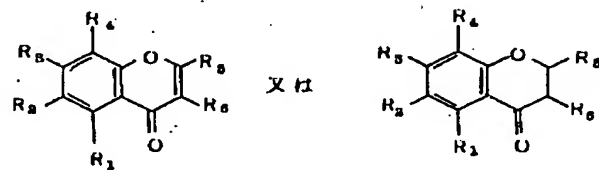
(2) 経口投与形態による特許請求の範囲第1項記載の制癌剤。

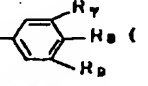
(3) 経口投与形態による特許請求の範囲第1項記

載の制癌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、一般式：



[ただし、式中、 $R_1, R_2, R_3, R_4$  は、 $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$ 、 $R_5, R_6$  は、 ( $R_7, R_8, R_9$  は  $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$  を示す。)、 $H$ 、 $OH$  又は  $OCH_3$  を示す。]

で表わされるフラボノイド又はイソフラボノイド化合物を有効成分として含有することを特徴とする新規な制癌剤に関するものである。

従来、癌化学療法剤として、アルキル化剤(ナイドロジェンマスタード類、エチレンイミン類、スルホン酸エステル類)、代謝拮抗物質(炭酸拮抗

刑、プリン拮抗剤、ピリミジン拮抗剤)、植物性核分裂剤(コルセミド、ビンブラスチン等)、抗生物質(サルコマイシン、カルチノフィリン、マイトマイシン等)、ホルモン類(副腎ステロイド、男性ホルモン、女性ホルモン)及びホルフィリン銅酸(マーフィリン、copp)等が用いられている。しかしながら、その殆んどは、細胞増殖の物質であり、重大な副作用を呈するため、低毒性で優れた制癌活性を有する制癌剤の開発が強く望まれている。

そこで、本発明者らは、上記の趣旨に鑑み、低毒性で制癌活性を有する物質について探索、鋭意研究の結果、前記一般式を有するフラボノイド又はイソフラボノイド化合物が動物の腫瘍細胞に対して分化誘導活性を有することを断たに見出し、且つ該物質が著しく低毒性で、優れた制癌活性を有することの新たな知見を得て、本発明の制癌剤を完成するに至つた。本発明の制癌剤の有効成分は、人、豚、犬、猫等の温血動物に対する優れた癌化学療法剤となり得るものである。

本発明の有効成分であるフラボノイド又はイソフラボノイドとしては、例えば、次の化合物を挙げるができる。

- (1) ゲニステイン (Genistein) : 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone
- (2) ダイゼイン (Daidzein) : 4', 7-dihydroxyisoflavone
- (3) フラボン (Flavone)
- (4) フィセチン (Fisetin) : 3, 3', 4', 7-tetrahydroxyflavone
- (5) ミリセチン (Myricetin) : 3, 3', 4', 5, 5', 7-hexahydroxyflavone
- (6) ナリンゲニン (Naringenin) : 4', 5, 7-trihydroxyflavanone
- (7) フラバノン (Flavanone)
- (8) ノビレチン (Nobiletin) : 3', 4', 5, 6, 7, 8-hexamethoxyflavone
- (9) クベルセチンペンタメチルエーテル (Quercetinpentamethylether) : 3, 3', 4, 5, 5'-pentamethoxyflavone

- (10) イリゲニン (Irigenin) : 3', 5, 7-trihydroxy-4', 5', 6-trimethoxy isoflavone

これらの化合物は、図1表に示す如く、いずれも公知の化合物であり、構造式及び物理的性質は次の通りである(以下、上記化合物番号をもつて示す。 )。

表 / 表

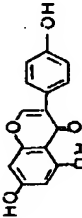
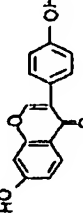
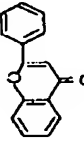
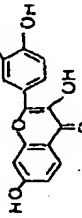
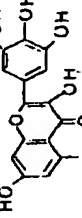
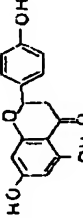
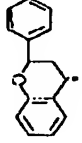
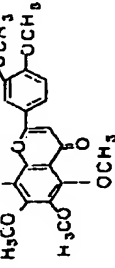
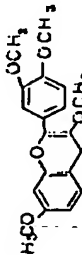
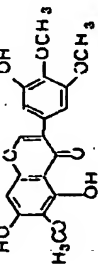
化合物名	構造式	物理的性質	参考文献 (文献)
(1)		無色針状結晶 m.p. 297~298°C (若干分解)	J. Pharm. Chim. (9) 1,404 (1941)
(2)		無色針状結晶 315~323°Cで分解	J. Chem. Soc. 1933, 274
(3)		無色結晶 m.p. 99~100°C	Org. Syn. coll. vol. II, 478 (1963)
(4)		無色針状結晶 330°Cで分解	Ber. 37, 784 (1904); J. Chem. Soc. 128 2334 (1926)
(5)		無色針状結晶 m.p. 357°C	J. Chem. Soc. 127 18 (1925)
(6)		針状結晶 m.p. 257°C	ber. 61, 2608 (1928); loid 75, 648 (1942)
(7)		無色針状結晶 m.p. 75~76°C	ロードローベンゾピリジン をHCl又はヒタノールで 蒸留する。
(8)		無色結晶 m.p. 130~131°C	Proc. Indian Acad. Sci. 27A 217-222 (1948)

表 / 表 (続き)

化合物名	構造式	物理的性質	参考文献 (文献)
(9)		m.p. 150~151°C	Proc. Indian Acad. Sci. 27A 493-497 (1940)
(10)		無色結晶 m.p. 125°C	Tetrahedron Letters n. 5, 6 (1960); J. Chem. Soc. (C) 1970, 1219

本発明の制癌剤は、経口及び非経口投与のいずれも使用可能であり、経口投与する場合は、軟・硬カプセル剤又は錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤として投与され、非経口投与する場合は、水溶性懸濁液、油性製剤などの皮下或いは静脈注射剤、点滴剤及び固状又は懸濁粘稠液状として持続的な粘膜吸収が維持できるように坐薬のような剤形で投与され得る。

本発明の有効成分の製剤化は、界面活性剤、賦形剤、消沈剤、佐剤、及び必要に応じて腸溶性製剤とするために医薬的に許容し得る賦形形成物質、コーティング助剤等を用いて適宜行うことができ、その具体例を挙げれば、次のとおりである。

本発明の組成物の崩壊、溶出を良好ならしめるために、界面活性剤、例えばアルコール、エステル類、ポリエチレングリコール誘導体、ソルビトールの脂肪酸エステル類、飽和化脂肪アルコール類等の1種又は2種以上を添加することができる。

また、賦形剤として、例えば乳糖、乳糖、ゲンブ、結晶セルロース、マンニト、酢酸無水糖

酸、アルミン酸マグネシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、合成珪酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の1種又は2種以上を組合せて添加することができる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を1種又は2種以上添加することができる。また矯味剤及び矯臭剤として、食塩、サツカリン、糖、マンニツト、オレンジ油、カンゾウエキス、クエン酸、ブドウ糖、メントール、ユーカリ油、リンゴ酸等の甘味剤、香料、着色料、保存料等を含有させてもよい。

融湯剤、融解剤の如き佐剤としては、例えばコナツト油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、乳酸カルシウム、ペニバナ油、大豆リン脂質等を含有させることができる。

また皮膚形成物質としては、セルロース、核酸等の炭水化物誘導体として酢酸フタル酸セルロース(CAP)、またアクリル酸系共重合体、二塩

基モノエステル類等のポリビニル誘導体としてアクリル酸メチル・メタアクリル酸共重合体、メタアクリル酸メチル・メタアクリル酸共重合体が挙げられる。

また、上記皮膚形成物質をコーティングするに際し、通常使用されるコーティング助剤、例えば可塑剤の他、コーティング操作時の薬剤相互の付着防止のための各種添加剤を添加することによつて皮膚形成剤の性質を改良したり、コーティング操作をより容易ならしめることができる。なお、有効成分を皮膚形成物質を用いてマイクロカプセル化してから賦形剤等と混合した剤型としても良い。

特に代表的な剤型における配合比は下記の通りである。

#### 特に好ましい錠剤

有効成分	0.1~90mg	0.3~15mg
賦形剤	10~99.8	8.5~99.4
滑沢剤	0~50	0~20
界面活性剤	0~50	0~20
皮膚形成物質	0.1~50	0.3~20

特に好ましい賦形剤は、乳糖、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムである。

また、投与量は、対象動物を有効に治療するのに十分な量であり、副作用の症状、投与経路、剤型などによつて左右されるが、一般に、経口投与の場合、大人では1日当り、約0.01~100mg/kg体重(小人では、0.01~60mg/kg体重)の範囲で、その上限は好ましくは約50mg/kg体重、更に好ましくは約10mg/kg体重程度であり、非経口投与の場合、その上限は約10mg/kg体重程度であり、好ましくは5mg/kg体重、更に好ましくは2mg/kg体重が適当である。

次に、本発明の化合物の制剤法を説明した制

造性試験について述べる。

#### [1] フレンド白血病細胞 (mouse erythroid

leukemia cell, B8細胞) に対する試験

GIBCO製HAMのF-12培地に、15%の牛胎児血清及び60mg/Lのカナマイシンを加えたものに、 $2.5 \times 10^4$  cell/mlとなるようにB8細胞を接種し、これに所定量の被験化合物を加える(培養容積5ml)。

2.5% CO<sub>2</sub>中、37℃7日間培養した後、オルキン(Orkin)のベンジジン染色法により染色し、染色された細胞数、すなわち、赤血球への分化によりヘモグロビンを生成するようになった細胞数を測定し、分化誘導率を求める。

$$\text{分化誘導率}(\%) = \frac{\text{染色された細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

#### [2] マウス骨髓性白血病細胞 (mouse myeloid

leukemia cell, M1) に対する試験

GIBCO製イーグルMEM培地に、10%の馬血清及び60mg/Lのカナマイシンを加えたものに、 $5.0 \times 10^4$  cell/mlとなるようにM1細胞

胞を接種し、これに所定量の糖類化合物を加える（最終容積5 ml）。

7.5% CO<sub>2</sub>中、37℃で7日間培養した後、貧食細胞、あるいは顆粒球への分化により誘導されたリゾチーム活性を調べる。なお、リゾチーム活性の1単位（unit）とは、マイクロツカス・リソテイクティカス（*Micrococcus lysodeikticus*）菌体の懸濁液を基質として、リゾチームを作用させ、pH 6.24、温度25℃で測定し、450 nmの波長の吸光度を毎分0.001減少させるようなリゾチームの量をいう。

〔3〕マウス奇形腫細胞（mouse teratocarcinoma）に対する試験：テラトーマ細胞をマウスの腹腔から腹腔へ移植後、1ヶ月経過したものを用いた。テラトーマ細胞は、腹腔中では初期胚に似た胚様体（embroid body）という細胞塊として存在し、それらをトリプシン処理などを行うことなく用いた。採取した腹水中で自然沈下させて得られる胚様体をメルベコ-塗法培地、あるいはハンクス液で3度洗浄後、10%牛胎児血清を含む培地に接

し、所定量の被験化合物を加え、37℃でCO<sub>2</sub> 7.5~8%を含む水蒸気を飽和して、空気中で1週間培養する。遠心分離（2000 r.p.m./10分）して得た胚様体を0.86% NaCl溶液で洗浄後、ナフトールAS-MXホスフエートとジアゾ試薬（Fast Violet B Salt）を加えて1時間室温で放置する。これを遠心分離（2000 r.p.m./10分）して胚様体を分離し、エタノールを加えて1時間室温で放置する。

（未分化の細胞は、赤く染色する）。

これを、535 nmの吸収を測定し、アルカリホスファターゼ活性（分化誘導の程度）を求める。

ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMB A）5 mMを加えた場合（アルカリホスファターゼ活性を全く示さない。）を「++」とし、HMB Aを加えない場合（アルカリホスファターゼ活性を極めて強く示す。）を「--」とし、分化誘導の程度を次の段階で示した。

++：アルカリホスファターゼ活性を全く示さない。

++：アルカリホスファターゼ活性をほとんど示さない。

++：アルカリホスファターゼ活性を若干示す。

++：アルカリホスファターゼ活性を強く示す。

++：アルカリホスファターゼ活性を極めて強く示す。

なお、後述の試験例では、分化誘導作用をもつて、制癌活性を示した。

以下に、本発明を製剤例及び試験例によつて具体的に説明する。

#### 製剤例1（注射・点滴剤）

化合物(1) 10 mgを含有するように粉末ぶどう糖5 gを加えてバイアルに無菌的に分配し、密封した上、窒素、ヘリウム等の不活性ガスを封入して暗所に保存する。使用前にエタノールに溶解し、0.85%生理的食塩水100 mlを加えて静脈内注射剤とし、1日、10~100 mlを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

#### 製剤例2（注射・点滴剤）

化合物(2) 2 mgを用いて、製剤例1と同様の方法

により難症用静脈内注射剤とし、1日、10~100 mlを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

#### 製剤例3（腸溶性カプセル剤）

化合物(3) 5 g、乳糖2.46 g及びヒドロキシプロピルセルロース0.04 gを各々とり、よく混合した後、常法に従つて粒状に成形し、これをよく乾燥して篩別してピン、ヒートシール包装などに適した顆粒剤を製造する。次に、酢酸フタルセルロース0.5 g及びヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート0.5 gを溶解して糊性基材となし、前記顆粒を浮遊流動させつゝこの基材を被覆して腸溶性の顆粒剤とする。この組成物をカプセルに充填して腸溶性カプセル製剤100個を製造する。

#### 試験例

第1例の化合物を用い、前記試験法〔1〕、〔2〕及び〔3〕より、フレンド-白血病細胞の分化誘導率、マウス骨髄性白血病細胞の分化誘導によるリゾチーム活性及びマウス奇形腫細胞の分化誘導程度を調

べたところ、それぞれ、第2表、第3表及び第4表に示す結果が得られた。

第 2 表

化合物名 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	分 化 誘 導 率 (%)										エタノール**	対 照
	(1) *	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)			
500	35	—	—	—	25	—				<<1	0	
250	40	—	—	0	13	—	56	2	28			
125	50	—	—	0	15	—	35	76	25			
63	20	—	15		15	35	64	34	15			
32	8	ca.100	20	<<1	8	20	16		9			
16	14	10	15	8	$\leq 2$	8	27	3	6			
8	7	13	10	<3	$\leq 2$	1	25		9			
4		<5	<3	<<1	<1	<<1	<10	4	5			

\* 分化誘導率(%)に該当する試験は、それぞれ400、200、100、50、25、12、6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で行った。

\*\* 比較例20  $\mu\text{L}$





手 続 補 正 審

57. 10 - 8

昭和 年 月 日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示 昭和 57 年特許願第 15710 号

2. 発明の名称 制 癌 剤

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (679) 理 化 学 研 究 所

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 (電話 代 311-8711等)

氏 名 (5995) 弁 理 士 中 村 稔

5. 補正命令の日付 自 発

6.

7. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

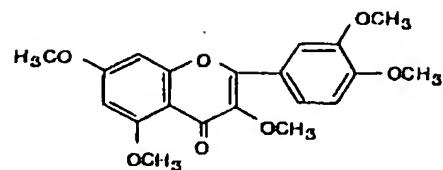
8. 補正の内容

( 57. 10. 12 )

特開昭 59- 46217(8)

明細書第 7 頁第 1 段の化合物 (9) の構造式を下記  
のとおり訂正する。

「



」